



УДК 578. 891.083.3:577.112.6

© 1993 Ю. А. Семилетов, В. А. Карпова,
В. Д. Смирнов, С. О. Вязов

ЛОКАЛИЗАЦИЯ ИММУНОДОМИНАНТНОГО САЙТА В СОСТАВЕ АНТИГЕНА ВИРУСА ГЕПАТИТА ДЕЛЬТА С ПОМОЩЬЮ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ

Институт вирусологии им. Д. И. Ивановского РАМН, Москва

Методом твердофазного синтеза получены пептиды, соответствующие участкам 65—80, 69—80, 71—80, 73—80, 69—78, 71—78, 71—76 антигена вируса гепатита дельта (HDAg), содержащие высоковариабельный фрагмент 73—76. Пептид 71—80 синтезирован в двух вариантах, различающихся аминокислотными остатками в положениях 73, 74 и 76. Получены конъюгаты пептидов с бычьим сывороточным альбумином (BSA). Исследовано влияние изменения длины цепи и аминокислотных замен на антигенную активность пептидов. Полученные результаты позволяют предполагать в составе дельта-антигена наличие нелинейной антигенной детерминанты или набора высокоиммуногенных эпитопов между 69-м и 80-м аминокислотными остатками.

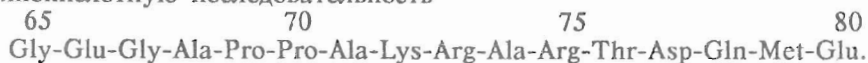
Среди вирусных гепатитов особое внимание исследователей в последние годы вызывает гепатит дельта. Это объясняется значительной тяжестью клинического течения острой формы заболевания и высокой частотой случаев хронизации болезни с формированием таких неблагоприятных последствий, как хронический активный гепатит и цирроз печени [1, 2].

Одно из наиболее перспективных направлений исследований, имеющих непосредственное отношение к проблемам диагностики и изучению механизмов патогенеза гепатита дельта, связано с анализом антигенной композиции возбудителя этого заболевания — вируса гепатита дельта. Как известно, едва ли не самым плодотворным подходом для решения комплекса задач по идентификации и локализации В- и Т-эпитопов белков является использование синтетических пептидов. Благодаря этому подходу тремя группами исследователей из США и России [3 — 5] были получены данные о возможности локализации антигенных детерминант в составе основного специфического белка HDV — дельта-антигена; так, в частности, было установлено, что по крайней мере один иммунодоминантный эпитоп HDAg расположен на участке между 65-м и 80-м аминокислотными остатками [5]. В настоящем сообщении представлены результаты более точной локализации данного эпитопа. С этой целью исследовали влияние изменения длины пептидной цепи и аминокислотных замен на антигенную активность пептидов из участка 65 — 80.

По данным, полученным в результате клонирования кДНК двух различных

Использованные сокращения: HDV — вирус гепатита дельта, HDAg — антиген вируса гепатита дельта, Acst — ацетамидометил, BSA — бычий сывороточный альбумин, EDIPA — этилдиизопропиламин, NOBt — 1-оксibenзотриазол, MBS — N-оксисулцинимидный эфир 3-малеинимидобензойной кислоты, TFMBA — трифторметансульфо кислота.

изолятов HDV и последующего секвенирования [6, 7], пептид 65—80 имеет аминокислотную последовательность



По другим данным, аминокислотная последовательность этого белка имеет отличия в позициях 73, 74, 76 (соответственно Lys, Leu, Met) [8]. Эти аминокислотные замены приходится на короткий участок 73—76, содержащий четыре аминокислоты.

В ходе исследования был осуществлен синтез серии пептидов длиной от 7 до 13 аминокислот, содержащих в своей последовательности переменный участок, а именно 71—76-Cys(Acm), 71—78-Cys(Acm), 69—78-Cys(Acm), 73—80'-Cys(Acm), 71—80', 71—80-Cys(Acm), 69—80-Cys(Acm) (звездочкой отмечены пептиды, аминокислотная последовательность которых отличается от приведенной выше для пептида 65—80 и содержит замены согласно данным [8]). Дополнительный С-концевой аминокислотный остаток Cys(Acm) вводили в пептиды для их конъюгации с BSA через сульфгидрильную группу Cys.

Пептиды были синтезированы на твердой фазе вручную с использованием Вос-Vzl-стратегии [9] в соответствии с методикой, предложенной в работе [5]. Нагрузка стартовой Вос-аминокислоты на хлорметилированный носитель (тефлон с радиационно привитым полистиролом) составляла 0,3—0,5 ммоль/г. α -Аминогруппы деблокировали 50% раствором TFA в хлористом метиле или, при наличии остатков Met, 35% раствором TFA в хлористом метиле с добавлением 10% анизол. Образовавшийся трифторацетат аминоацилполимера нейтрализовали 10% раствором EDIPA в хлористом метиле. Пептидную цепь наращивали с применением в основном метода симметричных ангидридов. Остаток Вос-Gln вводили в пептидилполимер методом активированных эфиров. Все стадии синтеза после введения Met в пептидилполимер осуществляли в атмосфере инертного газа. Полноту прохождения реакций конденсации контролировали с помощью нингидринового теста. Отщепление всех синтезированных пептидов от полимера проводили действием 1 М раствора TFMSA в TFA в присутствии тиоанизола с последующей очисткой гель-хроматографией на сефадексе G-10 в 10% водной уксусной кислоте. Образцы пептидов, предназначенные для анализа и исследований, дополнительно очищали полупрепаративной ВЭЖХ.

В качестве примера приведена схема синтеза пептида 71—80'. Пептиды были получены с выходом 18—25% и охарактеризованы с использованием ТСХ, ВЭЖХ, количественного аминокислотного анализа, определения удельных углов оптического вращения и N-концевых аминокислот (таблица).

Для проведения иммунологических исследований применялись как свободные пептиды, так и их конъюгаты с BSA. Конъюгаты пептидов с BSA получали с помощью MBS по SH-группе пептида [10] или используя глутаровый альдегид в случае пептида 71—80'. Степень конъюгации, определенная количественным аминокислотным анализом, в разных опытах составляла 10—15 молекул пептида на молекулу белка и 7—15 молекул в случае пептида 71—80'.

Антигенная активность свободных пептидов и их конъюгатов с BSA была исследована в прямом и непрямом вариантах иммуноферментного анализа как с индивидуальными препаратами сывороток крови пациентов, содержащих анти-HD-антитела, так и с четырьмя различными пулами, состоящими из 8—10 анти-HD-позитивных сывороток крови пациентов с хроническим гепатитом дельта. Изучалась также способность свободных пептидов реагировать с кроличьей антисывороткой, полученной ранее на конъюгат пептида 65—80 с BSA [5].

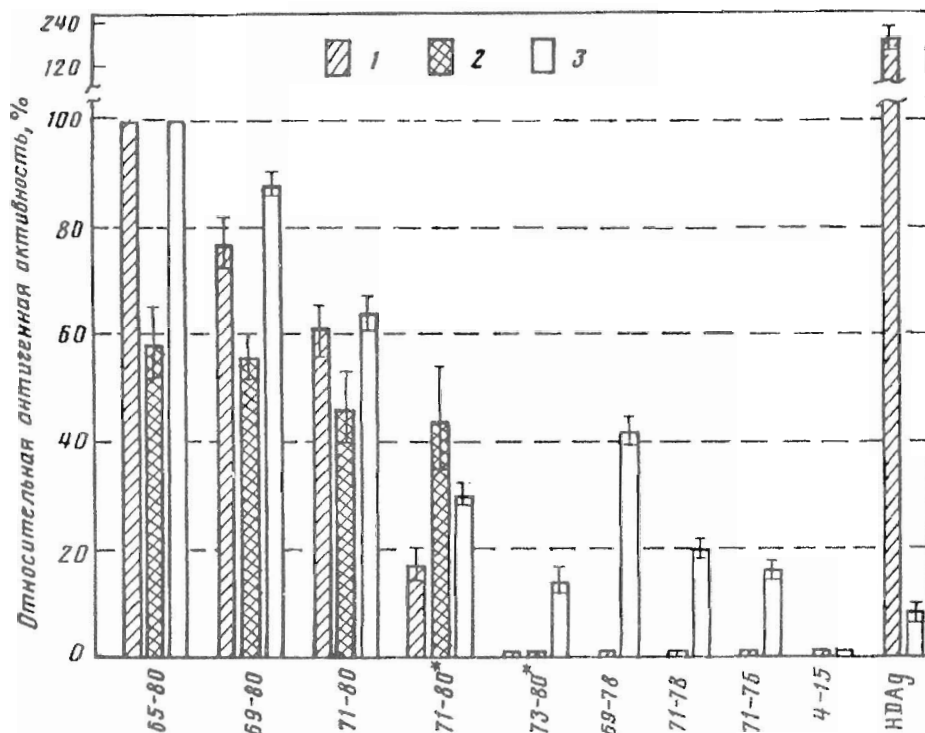
Данные иммунологических исследований представлены на рисунке, где в процентах приведена относительная антигенная активность девяти синтезированных пептидов и их конъюгатов с BSA с пулами анти-HD-позитивных сывороток. Относительная антигенная активность (A_0) пептидов рассчитывалась по формуле

Характеристики синтетических пептидов

| Пептид | Выход, % | R_f (ТСХ) | t_r , мин (ус- ловия* ВЭЖХ) | $[\alpha]_D^{20}$ град (с 1,0; H ₂ O) | N-Концевая Аас | Аминокис- лотный** анализ |
|--------------------|----------|-------------|-------------------------------------|---|-------------------|--|
| 69—80- Cys(Acm) | 19,5 | 0,26 | 6,4 (б) | -82,0 | Pro | D(1) 1,03 T(1) 1,00 E(2) 2,05 P(2) 1,85 A(2) 1,88 M(1) 0,80 K(1) 0,95 R(2) 1,78 |
| 71—80- Cys(Acm) | 25,0 | 0,21 | 7,5 (б) | -49,0 (с 0,5; 10% AcOH) | Ala | D(1) 1,12 T(1) 1,05 E(2) 2,03 A(2) 2,00 M(1) 0,70 K(1) 1,02 R(2) 1,99 |
| 71—80* | 21,0 | 0,63 | 17,7 (а) 10,2 (б) | -66,0 | Ala | D(1) 1,11 E(2) 2,20 A(1) 1,00 L(1) 1,07 M(2) 1,30 K(2) 1,87 R(1) 0,93 |
| 73—80* Cys(Acm) | 20,5 | 0,71 | 16,5 (а) 9,5 (б) | -36,0 | Lys | D(1) 1,07 E(2) 2,14 L(1) 1,00 M(2) 1,35 K(1) 0,89 R(1) 0,95 |
| 69—78- Cys(Acm) | 18,0 | 0,20 | 16,4 (а) | -53,0 | Pro | D(1) 1,11 T(1) 1,04 E(1) 1,11 P(2) 1,90 A(2) 2,00 K(1) 0,95 R(2) 1,88 |
| 71—78- Cys(Acm) | 22,0 | 0,42 | 9,4 (б) | -39,0 | Ala | D(1) 1,10 T(1) 1,05 E(1) 1,07 A(2) 2,00 K(1) 0,94 R(2) 1,82 |
| 71—76- Cys(Acm) | 22,5 | 0,33 | 13,5 (б) | -31,0 | Ala | T(1) 1,02 A(2) 2,00 K(1) 0,96 R(2) 1,90 |

* См. «Экспер. часть».

** Содержание остатков Cys количественно не определяли.



Относительная антигенная активность пептидов (1) и их конъюгатов с BSA (2) в реакции ИФА [17] с пулами анти-HDV-положительных сывороток крови пациентов. 3 — активность пептидов в реакции с сывороткой, полученной при иммунизации кроликов конъюгатом пептида 65-80 с BSA.

69—80 и 71—80 демонстрировали достоверную положительную реакцию с пулами сывороток, содержащих антитела к HDV. Дальнейшее укорачивание пептида как с N-, так и с C-конца (73—80, 69—78, 71—78 и 71—76) приводило к полному исчезновению способности полученных фрагментов связывать анти-HDV-антитела. Выявленная зависимость снижения антигенной активности от длины пептида, очевидно, обусловлена удалением аминокислотных остатков из антигенно-активного участка, но не связана с нарушением способности более коротких пептидов сорбироваться на твердой фазе при проведении ИФА. Об этом свидетельствуют положительные результаты реакции всех изученных пептидов, сорбированных на твердой фазе, с кроличьей антисывороткой к пептиду 65—80. Эта антисыворотка, очевидно, помимо антител непосредственно к иммунодоминантному участку пептида 65—80 содержит антитела к другим эпитопам, не входящим в состав этого сайта.

Конъюгаты пептидов 65—80, 69—80 и 71—80 с BSA, полученные с участием сульфгидрильной группы C-концевого остатка Cys, узнаются анти-HDV-положительными сыворотками хуже, чем свободные пептиды, что, вероятно, связано либо с частичным экранированием молекулой BSA функционально важных для проявления антигенности C-концевых остатков Met и Glu, либо с изменением конформации пептида под влиянием белка-носителя. Усиление активности конъюгата (71—80*)-BSA по сравнению с активностью свободного пептида 71—80* можно объяснить другим способом конъюгирования пептида с белком — через N-концевые аминогруппы пептида, что способствует, очевидно, более выгодному положению пептида для взаимодействия с антителами.

Сравнение пептидов 71—80 и 71—80* показывает, что антигенная активность первого из них более чем в 2 раза превышает активность второго. Этот факт может указывать на преобладание в нашей стране штаммов HDV, в которых

аминокислотная последовательность HDAg соответствует приведенной в работах Вэнга и Салданы [6, 7]. Факт взаимодействия пептидов 71—80° и 73—80° с анти-(65—80)-антителами кролика наводит на мысль, что в последовательности пептида не все аминокислотные остатки важны для взаимодействия со специфическими антителами и возможна замена отдельных аминокислотных остатков другими, близкими по свойствам и строению, с полным или частичным сохранением антигенных свойств детерминанты. В нашем случае взаимозаменяемые остатки лизина и аргинина функционально близки, остаток Met отличается от остатка Thr заменой атома серы на атом кислорода, однако следует отметить, что боковые цепи остатков Ala и Leu сильно различаются по своим пространственным параметрам. Было бы интересно более детально изучить характер взаимодействия пептидов с заменами аминокислотных остатков с сыворотками крови инфицированных людей из различных регионов России и других стран.

Помимо пулов человеческих сывороток в работе использовали индивидуальные сыворотки хронически инфицированных людей, содержащие высокие титры анти-HDV-антител. Пептиды 65—80 и 69—80 реагировали со всеми исследованными сыворотками, тогда как пептиды 71—80 и 71—80° и их конъюгаты с BSA взаимодействовали лишь с 83% из них. При рассмотрении этих результатов возникает вопрос: почему практически все индивидуумы в генетически высокоаутбредной популяции реагируют с одним и тем же антигенным сайтом? На наш взгляд, наиболее вероятное объяснение заключается в том, что участок 65—80 может содержать не одну антигенную детерминанту, а набор высокоиммуногенных эпитопов, вследствие чего специфика взаимодействия этого участка с антителами из сывороток того или иного индивидуума может варьировать. Для окончательного решения этого вопроса необходимо проведение специальных исследований, в частности конкурентного иммуноанализа с использованием более представительной панели сывороток.

В заключение следует отметить возможность практического использования факта идентификации иммунодоминантного сайта в молекуле дельта-антигена. На наш взгляд, на основе синтетического пептида 65—80 может быть сконструирован специальный конфирмационный тест, служащий для подтверждения позитивных результатов исследования сыворотки крови человека, полученных с помощью стандартных коммерческих иммуноферментных диагностических наборов.

Экспериментальная часть

Все использованные аминокислоты L-ряда. В синтезе пептидов применяли Вос-аминокислоты и следующие их производные: Thr(Bzl), ω -бензиловые эфиры Asp и Glu, Lys(Z), Arg(NO₂), Gln-ONp (Reanal, Венгрия), Вос-Cys(Acm) и DCC — препараты Serva (Германия), BSA, TFMSA, HOBt и EDIPA — Fluka (Швейцария).

В качестве полимерной матрицы служил тефлон с радиационно привитым полистиролом (10%) [11].

ТСХ пептидов осуществляли на пластинах Cellulose F (Merck, Германия) в системе пропанол — вода — 25% аммиак (6 : 1 : 3). Хроматограммы проявляли нингидрином.

ВЭЖХ пептидов проводили на приборе Du Pont (США) в следующих условиях: колонка 3,2 × 250 мм, носитель μ -Bondapak C18—10 мкм, элюция 0,1% TFA в воде — 0,1% TFA в 60% ацетонитриле (а) или 0,1% TFA в 30% ацетонитриле — 0,1% TFA в 60% ацетонитриле (б) в течение 20 мин; скорость потока 1 мл/мин, детекция при 220 нм.

Аминокислотный состав пептидов определяли на анализаторе Hitachi (Япония). Кислотный гидролиз проводили 6 н. HCl при 110°С в течение 24 ч.

Удельное оптическое вращение пептидов измеряли на поляриметре Perkin — Elmer 241mc (Швеция).

N-Концевые аминокислоты в пептидах определяли дансильным методом [12].

Присоединение стартовой Вос-аминокислоты. К 1 г хлорметилизованного полимера (0,6 мг-экв. Cl) [13], суспендированного в 5 мл DMF, прибавляли 1 ммоль Вос-аминокислоты, 0,14 мл (1 ммоль) триэтиламина и 75 мг (0,5 ммоль) иодистого натрия в качестве катализатора [14]. Смесь перемешивали 4 ч при 40—50° С. Температуру регулировали освещением реакционной смеси фотолампой мощностью 500 Вт. Полимер отфильтровывали, промывали DMF (3 × 10 мл), этанолом (3 × 10 мл), трижды эфиром и гексаном, высушивали в вакууме. Нагрузку стартовой аминокислоты определяли по данным количественного аминокислотного анализа.

Стандартный цикл пептидной конденсации на полимере методом симметричных ангидридов включал следующие стадии: 1) промывка хлористым метиленом (3 × 1 мин), 2) обработка 50% раствором TFA в хлористом метилене (5 + 25 мин), 3) промывка хлористым метиленом (3 × 1 мин), 4) обработка 10% раствором EDIPA в хлористом метилене (2 × 5 мин), 5) промывка хлористым метиленом (3 × 1 мин), 6) промывка DMF (3 × 1 мин), 7) конденсация с 2,5-кратным избытком симметричного ангидрида Вос-аминокислоты в DMF в течение 1—3 ч, 8) промывка DMF (3 × 1 мин). Объем однократной промывки 1 г пептидполимера 5 мл.

Симметричные ангидриды получали в хлористом метилене, используя на 1 ммоль Вос-аминокислоты 0,5 ммоль DCC. После выдерживания при 0° С в течение 0,5 ч реакционную смесь фильтровали. Фильтрат сразу вводили в реакцию пептидообразования или сначала упаривали в вакууме, остаток растворяли в DMF и реакцию с пептидполимером проводили в DMF. Вос-Gln вводили в конденсацию в виде *n*-нитрофенилового эфира, взятого в четырехкратном избытке, с добавлением эквимольных количеств HOBT в DMF.

Нингидриновый тест. Образец пептидполимера (5—10 зерен полимера) удаляли из реактора после промывки полимера DMF, следующей за реакцией конденсации, помещали в пробирку емкостью 10 мл, добавляли 1 мл свежеприготовленного 0,2% раствора нингидрина в воде и нагревали раствор до слабого кипения, которое поддерживали в течение 10 с. Тест считался отрицательным, если зерна полимера не окрашивались через 1,5—2 мин после прекращения нагрева. При глубом окрашивании образца полимера реакцию конденсации повторяли. Если тест проводили с образцом полимера, удаленным непосредственно из реакционной смеси, то использовали 0,2% раствор нингидрина в 50% водном пропанол-2.

Непрореагировавшие аминогруппы ацетилювали 1 ч 20% раствором уксусного ангидрида в пиридине, пептидполимер предварительно промывали пиридином.

Отщепление пептидов от полимерного носителя [15]. К 1 г пептидполимера последовательно прибавляли 12 мл TFA, 1,4 мл тиоанизола и 1,1 мл TFMSA. Смесь перемешивали 1 ч при 0° С и 1 ч при комнатной температуре. Полимер отделяли фильтрованием и промывали TFA (3 × 2 мл). Фильтрат и промывные жидкости объединяли, охлаждали до 0° С и добавляли диэтиловый эфир при перемешивании. Образовавшийся осадок отделяли центрифугированием, промывали диэтиловым эфиром и высушивали в вакууме.

Очистку пептидов проводили гель-хроматографией на колонке (2,5 × 50 см) с сефадексом G-10, уравновешенным 10% водной уксусной кислотой. Собирали и лиофилизировали фракции, выходящие с колонки со свободным объемом. Образцы пептидов, предназначенные для анализа и исследований, дополнительно очищали полупрепаративной ВЭЖХ (Nucleosil C18, 7 мкм, 10 × 250 мм в условиях опыта 2, скорость потока 4 мл/мин).

Конъюгирование пептидов через SH-группу остатка Cys. Для удаления Асп-защитной группы SH-функции цистеина 10 мкмоль пептида растворяли в 1 мл дегазированной 50% уксусной кислоты и добавляли 50 мкл свежеприготовленного водного 1 М раствора ацетата ртути(II). Выдерживали 2 ч при 20° С и смесь насыщали газообразным сероводородом. Осадок HgS отделяли центрифугированием, промывали 1 мл дегазированной воды. Раствор упаривали в вакууме, к остатку добавляли воду и упаривали до удаления следов сероводорода. Полученное вещество немедленно использовали для конъюгирования [16].

Для активирования белка-носителя 15 мг BSA растворяли в 1 мл 10 мМ Na-фосфатного буфера (рН 7,2), добавляли 50 мкл раствора MBS в DMF (24,8 мг/мл) и перемешивали 30 мин при комнатной температуре. Непрореагировавший MBS немедленно удаляли хроматографированием смеси на колонке с сефадексом G-25 в 50 мМ Na-фосфатном буфере [10].

Немедленно проводили реакцию между активированным BSA и 10 мг пептида со свободной SH-группой в Na-фосфатном буфере при рН 7,5 под азотом (3 ч). Затем раствор диализовали против 0,03% водного аммиака и лиофильно высушивали.

Конъюгирование пептида 71—80°. К раствору 5 мг BSA в 0,4 мл 10 мМ Na-фосфатного буфера (рН 7,2) добавляли 3,5 мг пептида и 150 мкл 20 мМ раствора глутарового альдегида в воде. Перемешивали 20 ч при 20° С. После окончания реакции смесь диализовали против воды, содержащей 0,03% аммиака, и лиофилизовали. Выход целевого продукта 7 мг.

Иммуноферментный анализ на твердой фазе

На 96-луночные планшеты (Linbro, Великобритания) были сорбированы пептиды в концентрации 100 мкг/мл и конъюгаты пептидов с BSA в концентрации 50 мкг/мл в 0,01 М бикарбонат-карбонатном буферном растворе (рН 9,5) в течение ночи при комнатной температуре. Центры неспецифического связывания были дополнительно блокированы 0,5% человеческим альбумином в течение 2 ч при 37° С. Затем планшеты были пятикратно отмыты физиологическим раствором с 0,1% тритоном X-100. Для разведения антител использовали буфер, содержащий 0,01 М трис-HCl (рН 7,5), 0,15 М NaCl, 0,1% тритон X-100, 10% fetalную бычью сыворотку.

В прямом варианте ИФА в лунки с сорбированными пептидами вносили в соответствующих разведениях антитела против HDAg, конъюгированные с пероксидазой хрена, инкубировали 2 ч при 37° С и отмывали.

В непрямом варианте ИФА в лунки с фиксированным антигеном добавляли соответствующие разведения специфических антител, инкубировали 2 ч при 37° С и отмывали как указано выше. Образовавшиеся иммунные комплексы выявляли с помощью конъюгированных с пероксидазой хрена антител против IgG кролика или человека.

Для проявления ферментативной активности применяли *o*-фенилендиамин в цитратном буфере в концентрации 0,5 мг/мл. Реакцию останавливали добавлением 10% H₂SO₄. Степень поглощения регистрировали на автоматическом спектрофотометре Titertek Multiskan (США) при длине волны 492 нм.

В качестве контроля использовали реакции тех же антигенов с нормальными сыворотками. Положительными считали пробы, в которых значения величины относительного связывания *S/N* были более 2,1 (*S* — значения поглощения в лунках с исследуемой сывороткой, *N* — значения поглощения в лунке с нормальной сывороткой).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Rizetto M.*//Hepatology. 1983. № 3. P. 729—737.
2. *Вязов С. О., Палади Н. Е., Мхитарян А. Л.*//Журн. микробиол. 1989. № 10. С. 96—103.
3. *Bergmann K. F., Cote P. J., Moriarty A., Gerin J. L.*//J. Immunol. 1989. V. 143. P. 3714—3721.
4. *Wang J. G., Jansen R. W., Brown E. A., Lemon S. N.*//J. Virol. 1990. V. 64. № 3. P. 1108—1116.
5. *Семилетов Ю. А., Карпова В. А., Худяков Ю. А., Павлюченкова Р. П., Вязов С. О., Смирнов В. Д., Прокуронова Е. И., Желтухина Г. А., Евстигнеева Р. П.*//Биоорганическая химия. 1992. Т. 18. № 2. С. 252—262.
6. *Wang K. S., Choo Q. L., Wiener A. J., Ou H. J., Thayer R. M., Mullenbach T., Denniston K. J., Gerin J. L., Houghton M.*//Nature. 1986. V. 323. № 6088. P. 508—513.
7. *Saldanha J. A., Thomas H. C., Monjardino J. P.*//J. Gen. Virol. 1990. V. 71. P. 1603—1606.
8. *Makino S. M. F., Chang C. K. S., Kamahora T., Vannier D. M., Govindarajan S., Lai M. M. C.*//Nature. 1987. V. 329. № 6137. P. 343—346.
9. *Atherton E., Sheppard R. C.*//Solid Phase Peptide Synthesis. IRL Press at Oxford University Press, 1989. P. 1—23.
10. *Liu F.-T., Zinnecker M., Hamaoka T., Katz D. H.*//Biochemistry. 1979. V. 18. P. 690—697.
11. *Сидорова М. В., Желтухина Г. А., Филиппович Е. И., Евстигнеева Р. П.*//Журн. орган. химии. 1986. Т. 56. Вып. 6. С. 1405—1442.
12. *Дэвели Т., Гергей Я.*//Аминокислоты. Пептиды. Белки/Ред. Незлин Р. С. М.: Мир, 1976. С. 274—281.
13. *Янг Дж., Стюарт Дж.*//Твердофазный синтез пептидов/Ред. Швачкин Ю. П. М.: Мир, 1971. С. 67—68.
14. *Даванков В. А., Рогожин С. В., Коршак В. В., Цюрупа М. П.*//Изв. АН СССР. Сер. хим. 1967. Т. 17. № 7. С. 1612—1614.
15. *Toida I., Yamamoto S., Takuma S., Suzuki T., Hirata H.*//Infection and Immunity. 1985. V. 50. № 3. P. 614—619.
16. *Самуков В. В., Каламшиков В. В., Офицеров В. И., Швалье А. Ф.*//Биоорганическая химия. 1985. Т. 11. № 8. С. 1037—1047.
17. *Иммуноферментный анализ*//Ред. Нго Т. Т., Ленхофф Г. М.: Мир. 1988. 444 с.

Поступила в редакцию
14.VII.1992

После доработки
26.VIII.1992

Yu. A. Semiletov, V. A. Karpova, V. D. Smirnov, S. O. Vyazov

LOCALIZATION OF IMMUNODOMINANT SITE IN THE HEPATITIS DELTA
VIRUS ANTIGEN WITH THE USE OF SYNTHETIC PEPTIDES

D. I. Ivanovsky Institute of Virology, Moscow

A set of 8 peptides from the immunodominant region (65—80 aa) of delta-antigen was prepared by solid-phase synthesis. Peptide 71—80 was synthesized in two variants — with different amino acid residues in positions 73, 74 and 76. Free peptides and their conjugates with bovine serum albumine were tested for antigenicity in ELISA. The correlation between the peptide chain's length and its antigenic activity was noted. Peptides 65—80 and 69—80 displayed a positive reaction with all individual sera and pools of sera from HDV chronic patients. Both variants of the peptide 71—80 reacted with 100% of sera pools but only with 83% of individual sera. Smaller peptides from the same 65—80 region (73—80, 69—78, 71—78, 71—76) did not bind to any anti-delta positive serum. All synthesized peptides reacted strongly with rabbit antisera raised to the conjugate of peptide 65—80 with bovine albumine. These findings suggest that delta-antigen contains multiple highly immunogenic epitopes associated with the single immunodominant site between 69 and 80 amino acid residues.